

201133023A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究  
- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -  
(H23-化学 - 一般 - 005)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究  
- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -  
(H23-化学 - 一般 - 005)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究  
- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -  
(H23-化学 - 一般 - 005)

平成23年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 今井田 克己  
平成24(2012)年3月

## 研究報告書目次

## 目 次

## I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

今井田 克己 ..... 1

## II. 分担研究報告書

## 1. ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

今井田 克己 ..... 11

## 2. ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

小川 幸男 ..... 27

## 3. ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

高橋 祐次 ..... 47

## 4. DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

高木 篤也 ..... 59

## 5. 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

相磯 成敏 ..... 69

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 89

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 90

# I . 総括研究報告書

総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

・全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -

研究代表者 今井田 克己

香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究要旨

先行研究において、厚労省の「ナノマテリアルの安全性対策に関する検討会」の方針に従い、高生産量ナノマテリアルのうち、特に、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ：Multi wall carbon nanotubes (MWCNT) を対象として、経気道暴露時の生体影響について検討してきた。具体的には、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立衛研・環境保全型動物飼育棟内に人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。ナノマテリアル (NM) の有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、NMが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。本研究では、音響式ダスト発生装置（米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 考案）の基本概念を導入し、これに検体に触れる部品を廃棄可能な構造とした独自のチャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした上記施設を使用する。運用上残された課題は、検体の特性に合わせての暴露制御パラメータ（送風量・圧、音響音圧・周波数）の最適化である。

本研究では、この設備を用いてNMのヒト健康影響の評価手法に関する研究として MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験を三か年計画で実施す

る。本研究班では針状タイプのMWCNT (MWNT-7、三井物産 (現 現保土ヶ谷化学(株)) を共通の研究対象とし、雄性C57BL/6J マウスを用いて動物実験を行うことに統一した。初年度は各分担研究者が、それぞれの研究分担分野で研究班全体の研究基盤の構築に寄与する研究を行った。研究班を次の5つの分担研究によって構成し研究を開始した。ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究 (小川)、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究 (高橋)、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析 (高木)、強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究 (相磯)、ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変) (今井田) である。

今年度 (平成23年度)、小川は、全身暴露吸入方法の検討のため、米国 NIOSH が考案した音響式ダスト発生装置の基本概念を導入し、独自の暴露チャンバーを組み合わせ、同時に3群の実験 (1群最大16匹) を可能とした全身暴露吸入試験装置の設置を行った。運用上課題としていたMWCNTの特性に合わせての暴露制御パラメータ (送風量・圧、音響音圧・周波数) の最適化を行い、吸入暴露条件を確立することに取り組んだ。高橋は、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行った。MWCNTを検体として、マウスの肺からMWCNTを抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着したMWCNTのサイズの測定を行った。また、水酸化カリウム、SDS及びEDTAからなる肺溶解液を独自に開発し、走査型電子顕微鏡による観察に適したサンプルを得る方法を確立した。高木は、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、雄C57BL/6マウスにナノマテリアルとしてMWCNTを単回吸入暴露 (4時間全身曝露) 後のマウスの肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome法) を行なった。相磯は、マウス気管内投与器具の開発と投与技術を確立と、MWCNT原末を高度に分散処理したMWCNT (Taquann法処理-MWCNT) を用いた単回気管内投与による28日試験と3ヶ月試験を実施した。今井田は、投与したMWCNTの肺組織内での局在を観察するため、まずMWCNTの光学的特性の研究を行った。その後、気管内投与の予備実験として58週齢A/Jマウスおよび12週齢C57BL/6Jマウスを用いて気管内投与を行い、病理組織標本を作成し、検討を行った。

以上、5つの分担研究により、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究と

して、MWCNT の全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行うために重要な研究基盤構築を行うことができた。次年度も継続して、詳細な検討を継続し、MWCNT の全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う予定である。

## A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) は極めて微細であることから、組成が同じものでも新たな物性が発揮される特徴がある。その為、毒性学的にも元のバルク形状のものの毒性情報があつたとしても、新規のものとして取り扱う必要があるとの認識が支配的である。本研究の目的は、肺に焦点を絞り、工業的 NM の吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することにある。

そもそも、粒子状物質の有害性に関する情報は極めて少ない。その理由は、吸入暴露を実施できる施設がごく限られることにある。NM は、凝集体を作りやすい傾向があり、その吸入暴露においては分散性を確保するために、更に高度な運用技術が必要とされ、国際的にも信頼できる吸入暴露実験を行える研究施設は少ない。しかしながら、NM 開発で世界をリードする日本において、複数種の Multi wall carbon nanotubes (MWCNT) に代表される NM の製品化が急速に進んでおり、これらの安全性確認の方策の早期確立が必要である。過去のアスベストやトロトラスの事例が示す様に、物理化学的安定性が高い成分からなる粒子状物質は急性毒性が弱いことから、その慢性毒性が見過ごされる傾向にあ

る。NM も炭素など安定性が高い成分で出来ている場合は、発がん性を含む慢性毒性を見極める必要がある。以上より、実験動物の個体を用いた全身暴露による吸入毒性試験の実施が必須であり、また、初期病像に加え、慢性影響を十分に観察する必要がある。

本研究の特色は、先行研究で、米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) が考案した音響式ダスト発生装置による分散方式がカーボンナノチューブの吸入暴露に最適であるとの判断の下に導入した施設 (スピーカーからの音響エネルギー (定在波) を用いて MWCNT を分散させるもの) を用いて、検体に適合した制御パラメータ (送風量、送風圧、音響音圧・周波数) の最適化を行えば、早急に暴露実験を開始できるところにある。

本研究では、初年度に吸入暴露装置の制御パラメータ最適化に取り組んで暴露手法を確立し、次いでその暴露装置を用いて MWCNT を暴露したマウスの肺及び全身への蓄積性、肺の病理組織学的解析、肺の組織反応の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析を行う。この研究は、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験の確立から、毒性発現メカニズムを含めた有害性情報の獲得までを総合的に手がけるものとして世界的に例



が無く、詳細な検討を行うことが本研究の目的である。

## B. 研究方法

先行研究[H20-化学-一般-006]の成果を踏まえ、日本での使用量が最も多く、また、その形状からアスベストと同様の毒性が懸念されるMWCNTを被験物質として研究を行なう。本研究を遂行する香川大学、国立医薬品食品衛生研究所及び中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターは、ナノマテリアルを用いた動物実験を実施した実績を有している。

本研究では雄性マウスを使用してMWCNTの生体影響を調べる。初年度は、国立医薬品食品衛生研究所では既に設置済みの全身吸入曝露施設の、検体に応じた運用条件の確立に注力する。香川大学と中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センターでは、初年度より気管内投与方法により生体影響を評価する。遅くとも2年目までに全身吸入曝露試験を開始する。これと並行して、気管内曝露及び吸入曝露による肺の急性及び慢性反応について、病理組織学的評価（光顕、電顕、免疫染色、他）を行ない腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の誘発に関わる背景、経過、要因を経時的に用量相関性を以って解析する。

### B-I ナノマテリアルの全身曝露吸入方法に関する研究

先行研究において、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示されたMWCNTを対象として、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立医薬品食品衛生研究所・環境保全型動物飼育棟内に、人体の曝露様式に即した全身曝露吸入試験装置の設置を行った。この装置は、米国 NIOSH が考案した音響式ダスト発生装置の基本概念を導入し、独自の曝露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能としたものである。本分担研究では、運用上残された課題であるMWCNTの特性に合わせての曝露制御パラメータ（送風量・圧、音響音圧・周波数）の最適化を行い、吸入曝露条件を確立することに取り組んだ。検体はMWCNT（MWNT-7、三井）を用いた。曝露濃度の制御は、曝露チャンバー内の相対濃度をパーティクルカウンター（最小検出直径0.3  $\mu\text{m}$ ）で測定し、フィードバック制御によりスピーカーの電圧をコントロールして行った。なお、分散処理についての検討を行い、MWCNTの分散処理法の確立について検討した。

### B-II ナノマテリアル吸入曝露による体内動態に関する研究

本研究では、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルの吸入曝露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することを目的としている。そのために、人体の曝露様式に即した全身曝露吸入試験装置を用いてナノマテリアルの全身曝露吸入試験を実施し、用

量作用関係を含む有害性情報の取得、及びその詳細な病態解析を進めている。本分担研究では、生体影響の用量作用関係を明らかにするための情報として、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行った。具体的には、カーボンナノチューブ（CNT）の一つであるMWCNTを検体として、マウスの肺からMWCNTを抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着したMWCNTのサイズの測定を行った。

#### B-III DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、雄 C57BL/6マウスにナノマテリアルとして MWCNT を単回吸入暴露（4時間全身曝露）後、1、3、及び7日目の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析（Percellome 法）を行なった。曝露装置には米国 NIOSH が開発した音響式ダスト発生装置を基に毒性部が国立衛研内に設置した施設を用いた。

#### B-IV 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

粒子状物質のヒトへの暴露は吸入による経気道経路が主な暴露経路であるが、粒子の形状、長さ、太さ、粒子表面の物理化学的性状、金属不純物等がその毒性発現に関与し、単粒子/繊維に分散したものと大きな凝集塊を形成したものでは、肺への到達深度が異なり、その毒性発現も異なる。MWCNT の呼吸器毒性も暴露され

る CNT のサイズによって異なると予想される。製品として販売されている MWCNT 原末には、単繊維に分散したのから大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれており、先行研究の平成20-22年度厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究（福島班）では、MWCNT 原末の気管内投与によるラットへの毒性影響を調べて、一定の成果を得た。ヒトが吸入暴露を受けた際、大きな凝集塊は上部気道でトラップされて除去されるため、肺には分散した MWCNT が暴露されるという低濃度域での暴露が予想される。本分担研究では、実際にヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した高度に分散した MWCNT の気管内投与によるマウスを用いた短期間の実験を行って、呼吸器を主体とした毒性影響を、光学顕微鏡レベルの検索と超微細形態レベルでの検索を併用して検索する。また、先行研究で得られた MWCNT 気管内投与ラット肺サンプルについて透過型電子顕微鏡による MWCNT による肺毒性の病態解析を行った。

#### B-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNT の雄性C57BL/6J マウスへの気管内投与による肺病変の検討を行った。また、吸入したMWCNT の分布を確認するため、肺組織内での局在の同定の予備試験として、平成23年度は、MWCNT

の光学的特性の研究を行った。MWCNT原末を高度に分散処理したMWCNT (Taquann法処理-MWCNT)を用いた単回気管内投与による予備実験を実施した。なお、肺内でのMWCNTの局在を同定するための方法として肺の透明化液 (SCALECIEW-A2) による検討も合わせて行った。

MWCNTの光学的特性を分光蛍光光度計およびシングルフォトンレーザーにより検討した。58週齢A/Jマウスおよび12週齢C57BL/6Jマウスを用いて気管内投与を行い、投与後1日および3日後の肺組織の病理組織標本を作成した。その他様々な検討法について病理組織標本の分析を進めている。

## C. 研究結果

### C-I ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

先行研究において、国立医薬品食品衛生研究所・環境保全型動物飼育棟内に、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。暴露濃度の制御は、暴露チャンバー内の相対濃度をパーティクルカウンター (最小検出直径  $0.3 \mu\text{m}$ ) で測定し、フィードバック制御によりスピーカーの電圧をコントロールして行った。暴露制御パラメータの検討の結果、4時間の暴露時間、200,000 cpm を設定値とした条件において、平均重量濃度 (±標準偏差) は  $0.273 \pm 0.045 \text{ mg/m}^3$  が得られた。暴露チャンバー内のMWCNTを走査型電子顕微鏡で観察すると80%以上が単離された状態にあり、長さが  $10 \mu\text{m}$  以下の線維が60% (幾何平均長  $11.6 \mu\text{m}$ )

を占め、 $20 \mu\text{m}$ を超える線維も15%含まれていた。最適化された暴露条件下で実際にマウスに暴露を行い、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。加えて、MWCNT原末を高度に分散処理する独自の方法 (Taquann法) を開発した。Taquann法で処理した検体は液相にも気相にも速やかに再分散する。吸入暴露実験に供したところ、従来のパーティクルカウンターによる検出が困難となったため、現在、凝縮粒子カウンターを導入し条件検討を進めている。

### C-II ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

MWCNTを投与したマウスの肺からMWCNTを抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着したMWCNTのサイズの測定を行った。水酸化カリウム、SDS及びEDTAからなる肺溶解液を独自に開発し、走査型電子顕微鏡による観察に適したサンプルが得られた。MWCNT (MWNT-7、三井物産 (現 現保土ヶ谷化学(株))) の原末と、高度に分散処理したTaquann法処理-MWCNTを音響式ダスト発生装置によりマウスに全身暴露吸入し、肺に沈着したMWCNTの観察を行った。Taquann法処理-MWCNTは、原末よりも長いMWCNTが観察された。分散性の高いTaquann法処理検体は、鼻腔など呼吸器の上部で捕捉されるものが少なく、気管、気管支及び肺にまで到達した可能性が考えられる。

### C-III DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現

## 変動解析

雄 C57BL/6 マウスにナノマテリアルとして MWCNT を単回吸入暴露 (4 時間全身曝露) 後、1、3、及び 7 日目の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome 法) を行なった。曝露装置には米国 NIOSH が開発した音響式ダスト発生装置を基に毒性部が国立衛研内に設置した施設を用いた。マイクロアレイ解析の結果、免疫応答に関連する遺伝子発現が増加することが明らかとなった。また、Circadian rhythm に関係する遺伝子発現が変化していることが新たに明らかとなった。この変化については肺の炎症あるいはそれに反応した抗炎症作用に関連する可能性が考えられた。

## C-IV 強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究

マウス気管内投与器具の開発と投与技術を確認し、MWCNT 原末を高度に分散処理した MWCNT (Taquann 法処理-MWCNT) を用いて単回気管内投与による 28 日試験と 3 ヶ月試験を実施した。28 日試験では気管支肺胞洗浄液を採取して各パラメータを測定した。その結果、高度に分散処理した針状型 MWCNT ではこれまで報告されている  $10 \mu\text{g}/\text{匹}$  よりもさらに低い  $3.3 \mu\text{g}/\text{匹}$  で肺に影響が認められることが示された。病理組織的検索を目的とした 3 ヶ月試験では、投与後 3 ヶ月の解剖を終え、現在、病理組織標本の作製を進めている。先行研究 (平成 20-22 年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法

に関する研究 (福島班) で得られた MWCNT 気管内投与ラット肺サンプルの透過型電子顕微鏡による検索を行い、針状 MWCNT による肺胞壁/胸膜でのリンパ流路の循環障害が中皮細胞に二次的な変性を引き起こす知見を得た。

## C-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変)

MWCNT の光学的特性を分光蛍光光度計およびシングルフォトンレーザーにより検討した。分光蛍光光度計では、優位なピークは認められず、シングルフォトンレーザーによる励起を行ったが蛍光は認められなかった。58 週齢 A/J マウスおよび 12 週齢 C57BL/6J マウスを用いて気管内投与を行い、投与後 1 日および 3 日後の肺組織の病理組織標本を作成した。MWCNT が集塊となっているものは光学顕微鏡での検出は容易であるが、集塊を形成していないものは観察が困難なものもあった。この結果から光学顕微鏡のみでは確認できないほど MWCNT が分散している可能性等が考えられた。全身吸入暴露後のマウス肺組織における病理組織標本では、光学顕微鏡での観察では明らかな MWCNT を同定することはできなかった。現在、気管内投与試験および全身吸入暴露試験のいずれの病理組織標本において、ハイパーイメージング装置等の解析を行っているところである。なお、MWCNT を気管内投与し、その 52 週間後の慢性および腫瘍性病変の評価するための試験を開始する準備を整えた。各研究班とも連携し、投与後 52 週の長期試験を開始するところである。

#### D. 結論

アスベストに関する知見からも推測されるように、生体内に取り込まれた難分解性粒子は、急性毒性を示さないものの生体内で長期間留まり、重篤な慢性毒性を引き起こす可能性が懸念される。難分解性のナノマテリアルにおいても、慢性毒性を見落とさないことが重要であるほか、粒子がごく微細であることから、元のバルク形状での毒性とは異なった生体影響を示す可能性があり、その健康被害を未然防止するためには生体影響と暴露量の定量的な把握と毒性発現メカニズムに関する情報を得ることが必要である。

本年度は、各研究班において、それぞれ総合的な評価を行うために必要な複数の検討を行い、次年度以降の評価を行う上で、基盤となる研究を行うことができた。

具体的には、全身暴露吸入試験装置の運用上課題としていた、MWCNT の特性に合わせた暴露制御パラメータ（送風量・圧、音響音圧・周波数）の最適化を行い、吸入暴露条件を確立することができた。全身吸入暴露後のマウスの肺から MWCNT を抽出する方法の確立と、実際に全身暴露吸入したマウスの肺に沈着した MWCNT のサイズの測定を行うことができた。また、水酸化カリウム、SDS 及び EDTA からなる肺溶解液を独自に開発し、走査型電子顕微鏡による観察に適したサンプルを得る方法を確立した。ナノマテリアルの生体障害作用を

分子レベルで明らかにするため、雄 C57BL/6 マウスにナノマテリアルとして MWCNT を単回吸入暴露（4 時間全身曝露）後のマウスの肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析（Percellome 法）を行い、免疫応答に関連する遺伝子発現が増加することが明らかとなった。また、Circadian rhythm に関係する遺伝子発現が変化していることが新たに明らかとなった。なお、気管内投与については、マウス気管内投与器具の開発と投与技術を確立し、MWCNT 原末を高度に分散処理した MWCNT（Taquann 法処理-MWCNT）を用いた単回気管内投与による 28 日試験では、これまで報告されている  $10 \mu\text{g}/\text{匹}$  よりもさらに低い  $3.3 \mu\text{g}/\text{匹}$  で肺に影響が認められることが示された。MWCNT の光学的特性の研究も行い、MWCNT が集塊となっているものは光学顕微鏡での検出は容易であるが、集塊を形成していないものは観察が困難であった。光学顕微鏡のみでは確認できないほど MWCNT が分散している可能性等も推測でき、今後、ハイパーイメージング装置での観察の重要性が明らかになった。

本研究により、ナノマテリアルの吸入毒性試験の技術基盤が確立し、人体の暴露様式に即した条件下での生体影響に関する情報が得られる。また、吸入毒性試験を実施する際の課題である至適条件の決定を迅速に行う総合的手順が整うことから、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

この結果、用量作用関係の詳細な検討が

可能となり、ナノマテリアルの安全性確保の観点から閾値を設定することが可能であるか否かの合理的判断、リスクを最小化するための実質安全レベルの試算などを可能とする情報が得られると期待される。

総じて、本研究成果は、ナノマテリアルによる人の健康障害を防止するためのリスク評価の基盤となる科学的な裏づけデータを得る手法として利用され、国内外の行政施策への貢献を通して国民の健康維持に大きく貢献することが期待される。

次年度以降も、各分担研究とさらなる連携を行い、針状MWCNTによる肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行っていく予定である。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J., Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice, *Cancer Sci.* in press, 2012.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., [Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials]., *Yakugaku Zasshi.* 2011 Feb;131(2):195-201. Review.

Japanese.

### 2. 学会発表

菅野 純, 高木篤也, 西村哲治, 広瀬明彦, Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Nanomaterials, 第70回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋, 口演

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA), Oral

高信健司, 相磯成敏, 梅田ゆみ, 妹尾英樹, 片桐卓, 長野嘉介, 福島昭治: 気管内投与による多層カーボンナノチューブの脳内移行: 2011年, 第27回日本毒性病理学会, P-103

妹尾英樹, 高信健司, 梅田ゆみ, 片桐卓, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治: 1-ブロモ-3-クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変: 2011年, 第27回日本毒性病理学会, P-014

相磯成敏, 福島昭治: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺を中心とする有害性: 2011年, 第26回発癌病理研究会, 演題11

相磯成敏, 笠井辰也, 齋藤美佐江, 戸谷忠雄, 西沢共司, 有藤平八郎, 長野嘉介, 福島昭治: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の全身吸入曝露 2)ラットを用いた単回吸入曝露実験, 2011年, 第84回日本産業衛生学会, P-1-107

妹尾秀樹, 梅田ゆみ, 高信健司, 山崎一法, 戸谷忠雄, 鈴木正明, 加納浩和, 相磯成敏, 福島昭治: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の気管内投与後28日のラット肺における間質と中皮細胞の超微細形態学的変化, 2012年, 第85回日本産業衛生学会 (演題登録済み)

横平政直；橋本希；中野裕子；山川けいこ；  
岸宗佑；二宮芙美子；井上達史；竿尾光祐；  
今井田克己、胸腔内投与による針状微粒子  
TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会お  
よび学術集会、2012.02

横平政直；橋本希；山川けいこ；中野裕子；  
二宮芙美子；岸宗佑；井上達史；竿尾光祐；  
今井田克己、The promotion effects of lung  
tumor by left pulmonary ligation in A/J mice、  
第 70 回日本癌学会総会、2011.10

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今  
井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用  
いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸  
入と肺内負荷量の測定、第 39 回日本毒性学会  
学術年会、仙台国際センター2012. 7

Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa, Atsuya  
Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun  
Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of  
Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an  
Acoustical Dust Generator and Measurements  
of Its Body Burden in Lung, The 6th  
International Congress of Asian Society of  
Toxicology, July 17-20, 2012

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji  
Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial  
Toxicology - Importance of Chronic

Toxicity Assessment, Attendance at 5th  
International Conference on  
Nanotechnology - Occupational and  
Environmental Health, (2011.8.10) (Boston,  
USA), Oral

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今  
井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用  
いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸  
入と肺内負荷量の測定、第 39 回 日本毒性学会  
学術年会、仙台国際センター、2012 年（平成  
24 年）7 月 17 日（火） - 19 日（木）

Yuhji Taquahashil, Yukio Ogawa 1, Atsuya  
Takagi1, Shigetoshi Aiso2, Katsumi Imaida,  
Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of  
Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an  
Acoustical Dust Generator and Measurements  
of Its Body Burden in Lung, The 6th  
International Congress of Asian Society of  
Toxicology, July 17-20, 2012, Sendai  
International Center, Sendai, Japan

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書



平成23年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究-

分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）」

研究分担者 今井田 克己 香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究協力者 岸 宗佑 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
横平 政直 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
井上 達史 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
山川 けいこ 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
中野 裕子 香川大学医学部医学科腫瘍病理学

## 研究要旨

本研究では、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究として、全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験を三か年計画で実施する。針状のMulti wall carbon nanotubes (MWCNT) (MWNT-7、三井系統：保土ヶ谷化学工業)を研究対象とし、雄性C57BL/6J マウスを用いて動物実験を行うこととした。本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNTの気管内投与による肺病変の検討を行う。また、吸入したMWCNTの分布を確認するため、肺組織内での局在の同定の予備試験として、本年度は、MWCNTの光学的特性の研究を行った。MWCNT原末を高度に分散処理したMWCNT (Taquann法処理-MWCNT) を用いた単回気管内投与による予備実験を実施した。なお、肺内でのMWCNTの局在を同定するための方法として標本透明化液 (SCALECIEW-A2) による検討も合わせて行った。

MWCNTの光学的特性を分光蛍光光度計およびシングルフォトンレーザーにより検討した。分光蛍光光度計では、優位なピークは認められず、シングルフォトンレーザーによる励起

を行ったが蛍光は認められなかった。58週齢A/Jマウスおよび12週齢C57BL/6Jマウスを用いて気管内投与を行い、投与後1日および3日後の肺組織の病理組織標本を作成した。MWCNTが集塊となっているものは光学顕微鏡での検出は容易であるが、集塊を形成していないものは観察が困難なものもあった。この結果から光学顕微鏡のみでは確認できないほどMWCNTが分散している可能性等が考えられた。全身吸入暴露後のマウス肺組織における病理組織標本では、光学顕微鏡での観察では明らかなMWCNTを同定することはできなかった。現在、気管内投与試験および全身吸入暴露試験のいずれの病理組織標本において、ハイパーイメージング装置等の解析を行っているところである。なお、その他様々な検討法について病理組織標本の分析を進めている。

## A. 研究目的

粒子状物質のヒトへの暴露は吸入による経気道経路が主な暴露経路であるが、粒子の形状、長さ、太さ、粒子表面の物理化学的性状、金属不純物等がその毒性発現に関与し、単粒子/繊維に分散したものと大きな凝集塊を形成したものでは、肺への到達深度が異なり、その毒性発現も異なる。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器毒性も暴露されるCNTのサイズによって異なると予想される。製品として販売されているMWCNT原末には、単繊維に分散したものと大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれており、先行研究の平成20-22年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究(福島班)では、MWCNT原末の気管内投与によるラットへの毒性影響を調べて、一定の成果を得た。ヒトが吸入暴露を受けた際、大きな凝集塊は上部気道でトラップされて除去されるため、肺には分散したMWCNTが暴露されるという低濃度域での暴露が

予想される。本分担研究では、今後実際にヒトが吸入暴露した場合のモデルとして行われている全身吸入暴露試験の比較対象として高度に分散したMWCNTの気管内投与によるマウスおよびラットを用いた1年間の実験を行って、呼吸器を主体とした毒性影響を、病理組織学的に検討する予定である。

## B. 研究方法

### B-I MWCNTの光学的特性の検討

#### ① 分光蛍光光度計による検討

MWCNT (Taquann法処理-MWCNT-7)は、ごく小さな針状繊維で、繊維長は約1~10 $\mu$ m、繊維径は約30~120nmの構造をしている。MWCNTはごく小さな構造体であるため、投与後の各臓器での存在の有無、またその観察は困難なことが予想される。MWCNTの呼吸器系、特に肺内での分布を検討する目的で、MWCNTの光学的特性について研究し、光学的解析法による検出を検討した。まず、MWCNTの光学的特性を分光蛍光光度計(日本分光FP-6300型)

により検討した。観察するMWCNTは、Taquann法処理を施されているため、ターシャルブチルアルコール（tBuOH、石津製薬株式会社）を溶液として用い、MWCNTおよび溶媒であるtBuOHの蛍光高度を測定した。tBuOHは融点摂氏約25℃であるため、いずれの検討においても、観察している間は温水にて溶液の凝固を防ぎ、蛍光光度を測定後も溶液に結晶が形成していないこと、凝固していないことを確認して終了した。分光蛍光光度計の測定条件として、励起波長を220nm～750nm、励起側バンド幅を5nm、蛍光側バンド幅を5nm、データ取り込み間隔を5nm、走査速度を200nm/minとして詳細な検討を行った。

## ② シングルフォトンレーザー顕微鏡による検討

シングルフォトンレーザー顕微鏡の基本的な原理は、シングルフォトンレーザーにより検体物質に光子を吸収させ、電子エネルギー順位をあげることで蛍光が発せられることを利用した観察法である。物質によっては、ある特定の波長にて励起され蛍光を示すこともあるため、シングルフォトンレーザー顕微鏡（Carl Zeiss LSM 700）にてMWCNTの観察を行った。蛍光光度計での検討と同様に、MWCNT（Taquann法処理-MWCNT-7）をtBuOHに混濁した溶液と、tBuOH単体を材料に病理組織標本作成し検討した。病理組織標本作製において、カバーガラス周囲を粘性の高い封入剤を用いることで完全に密閉し、溶媒で

あるtBuOHの蒸発を防ぎ検討した。シングルフォトンレーザー顕微鏡では、455, 488, 555, 639nmの励起波長にて励起を行った。

## ③ 赤外フーリエ分光イメージングによる検討

中赤外および近赤外線領域の波長による検討を用いて、光学的特性を検討する予定である。本年度は、観察材料の作製や観察準備を行った。MWCNT（Taquann法処理-MWCNT-7）をtBuOHに溶解した溶液と、tBuOH単体を材料に、病理組織標本作成した。58週齢のA/Jマウス（日本エスエルシー）の雌7匹にMWCNT（Taquann法処理-MWCNT-7）（10 $\mu$ g/0.1ml tBuOH/mouse）を投与した肺組織から病理組織標本作製し、検討の準備を行った。

## B-II MWCNTのマウス気管内投与による検討

### ① 気管内投与に関する予備的検討

今までに当教室では、ラットでの気管内投与実験を数多く行っており、ラットへの気管内投与手技は確立している。本研究では、分担研究者が実施する全身吸入暴露実験と同様に、12週齢のC57BL/6Jマウスにて行うため、マウスを用いた気管内投与に関して予備的な検討を行った。マウスへの気管内投与に用いるゾンデとして、気道粘膜を傷つけることがなく挿入でき、検体を投与することができるDIMS型経気道ゾンデ（マウス用）（DIMS医科学研究所）を用いて全ての気管内投与実

験を行った（図 1、図 2）。

実際にヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した気管内投与実験を行うため、MWCNT ( $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の用量にて気管内投与を行った。1群 (3匹) : 屠殺直後気管から肺を取り出して気管より直接投与した群。2群 (2匹) : 気管内投与後1日目で屠殺した群。3群 (2匹) : 気管内投与後3日目で屠殺した群 (図 3)。Taquann 法処理-MWCNT を滅菌生理食塩水に Tween80 を 0.1% 添加した媒体に懸濁させ、超音波で分散させた。Taquann 法処理-MWCNT の投与用量は  $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$  とし、1匹当たりの投与用量は  $0.02\text{ml}/\text{匹}$  とした。気管内投与は投与液  $0.02\text{ml}$  の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気  $0.03\text{ml}$  で押し込むことによって肺内に注入した。なお、投与時の麻酔はネブタールの腹腔内投与により、過度の疼痛を与えることなく倫理的観点をふまえ、安全に行うことができた。

## ② 12週齢 C57BL/6J マウスを用いた気管内投与による検討

全身吸入暴露試験と同様に、実際に比較検討する12週齢 C57BL/6J マウス (日本クレア) の雄15匹を用い、11匹の投与群と4匹のコントロール群の2群に分けて実験を行った (図 4) 。投与する検体として、Taquann 法処理-MWCNT を滅菌生理食塩水に Tween80 を 0.1% 添加した媒体に懸濁させ、超音波で分散させたものを用いた。Taquann 法処理-MWCNT の投与用量は

$10 \mu\text{g}/\text{mouse}$  とし、1匹当たりの投与用量は  $0.02\text{ml}/\text{匹}$  とした。気管内投与は DIMS 型マウス用気管内投与ゾンデを用い、投与液  $0.02\text{ml}$  の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気  $0.03\text{ml}$  で押し込むことによって肺内に注入した。コントロール群には Tween80 を 0.1% 添加した滅菌生理食塩水を、1匹当たりの  $0.02\text{ml}$  投与した。気管内投与は投与群と同様に、投与液  $0.02\text{ml}$  の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気  $0.03\text{ml}$  で押し込むことによって肺内に注入した。投与後1日、3日後に屠殺し、肺、心臓および縦隔臓器を摘出し、ホルマリン固定後、病理組織標本を作成し検討した。

なお、投与時の麻酔はネブタールの腹腔内投与により、過度の疼痛を与えることなく倫理的観点をふまえ、安全に行うことができた。

## B-III MWCNT 全身吸入暴露後のマウス肺組織における病理組織学的検討

### ① 全身吸入暴露後のマウス肺組織の病理組織標本での検討

国立衛研毒性部 (全身吸入暴露による生体影響を分担研究) から提供を受けた全身吸入暴露を行った12週齢 C57BL/6J マウスの肺組織の標本作製を行った (吸入暴露条件(1) :  $290\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、4時間、暴露1日後、吸入暴露条件(2) :  $329\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、4時間、暴露3日後、およびコントロールとして非吸入暴露マウス)。光学顕微鏡による観察および蛍光顕微鏡、シング